

VÍRUSOK KIMUTATÁSA BÚZÁBAN PCR TECHNIKÁVAL**¹ÁY ZOLTÁN, ²KERÉNYI ZOLTÁN, ¹PAPP MÁRIA, ²SILHAVY DÁNIEL, ¹PAUK JÁNOS**

¹Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság,
6726 Szeged, Alsó kikötő sor 9.

²Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.
gyapesz@c2.hu

ABSTRACT – Detection of wheat viruses by PCR method

Thirty-one winter wheat samples were collected on 12th of April 2007 in Kecskés-telep, Szeged to detect the virus infections after a special mild wintertime. In Hungary, the most important cereal-viruses are BSMV (barley stripe mosaic virus), BYDV (barley yellow dwarf virus), WDV (wheat dwarf virus), and WSMV (wheat streak mosaic virus). Degrees of the natural infection symptoms caused by these viruses were different on the time of sample collection. Genomic DNA and total RNA were isolated from the leaves. This study represents a rapid method which permits simultaneous detection of three RNA-viruses and a DNA-virus using polymerase chain reaction (PCR). The symptoms are confirmed by the PCR-results. Virus infections were detected in the 86 % of the examined wheat population. The aphid-transmitted BYDV was found more frequently in comparison to the other three viruses. More than one virus species were detected in eight individual plants.

Kulcsszavak: búza, vírus, polimeráz láncreakció (PCR)

Keywords: wheat, virus, polymerase chain reaction (PCR)

BEVEZETÉS**Növényi vírusok kimutatására alkalmazott módszerek**

A gabonaféléket fertőző vírusok nagy részét a XX. század második felében fedezték fel. A virológia egyik legnagyobb kihívása volt a különböző vírusok elkülönítése, kimutatása. A tudományos eredmények fejlődésével újabb és újabb módszerek születtek, amelyek alkalmasnak bizonyultak e feladatra.

Kezdetben a vírusok detektálása jórészt vizuális alapon történt, amit az elektronmikroszkópok elterjedése és diagnosztikai célú használata segített a fertőzést okozó vírusok láthatóvá tételével. A kutatók a dohány mozaik vírust vizsgálták legbehatóbban, amely a vírusdiagnosztika modelljévé vált (HIDAKA és MURANO, 1957). A vírusok vizuális detektálását a későbbiekben újabb, főleg molekuláris technikák váltották fel.

A növényi vírusok köpenyfehérjéit antigénként felhasználva a fertőzöttség kimutatható (LISTER és ROCHOW, 1979). A szerológiai reakciók (ELISA-tesztek) alapelve az a felismerés, hogy ha melegvérű állat vérébe nagy molekulatömegű, fajidegen fehérje kerül, akkor ez az állat vérsavójában ellenanyagok képződését indukálja. Az antitestek a nekik megfelelő antigént felismerik, így létrejön az immunválasz-reakció, ami lehetővé teszi a kórokozó pontos azonosítását (HORVÁTH és GÁBORJÁNYI, 1999). A gabonaféléket fertőző legfontosabb vírusok ELISA-tesztekkel jól detektálhatók (CLARK, 1981; TORRANCE, 1991; SUKHACHEVA et al., 1996; ACHON és SERRANO, 2006).

Hibridizációs vizsgálatok során az előkészített nukleinsavmintákat agaróz gélen futtatva méret szerint szétválasztják, majd nylon- vagy nitrocellulóz-alapú filterre blottolják át. A filterhez kötött nukleinsavat radioaktív vagy színreakciót adó szondával hibridizálják. Blottoláskor számolni kell azzal, hogy alacsony kópiaszám esetén a

vírusfertőzés a kimutathatóság határa alatt maradhat (FÜLE és KOVALSZKY, 2002). Több kutatócsoport is sikerrel alkalmazta a hibridizációs módszereket az árpa sárga törpülés vírus kimutatására (HABILI et al., 1987; LIU et al., 2007).

Legismertebb és leghatékonyabb vírusdiagnosztikai eljárás a targetamplifikáció elvén alapuló polimeráz láncreakció (SCHWEITZER et al., 2001). PCR-rel akár 10^5 -szeres jelszorosítás is elérhető, tehát 5-10 víruskópia már kimutatható (FÜLE és KOVALSZKY, 2002). A reakció érzékenysége az adott vírustól és a növényi anyagtól egyaránt függ, de mindig nagyobb, mint a korábbi módszerek esetében (FIGUEIRA et al., 1997, MUMFORD et al., 2004; RATTI et al., 2004). Megfelelő primerpárok tervezésével a PCR sikerrel alkalmazható a gabonaféléket fertőző vírusok kimutatására is. Az árpa sárga törpülés vírus valamennyi törzsét sikerült így kimutatni (ROBERTSON et al., 1991; FABRE et al., 2003), illetve a kevésbé jelentős virális kórokozók okozta fertőzések is jól detektálhatók a módszerrel (CLOVER és HENRY, 1999; RATTI et al., 2004). További előnye a PCR-nek, hogy szimultán diagnosztizálást tesz lehetővé, így a komplex vírusfertőzések is kimutathatók vele (FRENCH és ROBERTSON, 1994; GITTON et al., 1999; MALMSTRON és SHU, 2004; MUMFORD et al., 2004).

A búzát leggyakrabban fertőző vírusok hazánkban

Földrajzi elterjedése következtében a búza számos növénypatogén kórokozó károsításának van kitéve. A legújabb kutatások szerint a fűféléket hatvanhét vírus képes megfertőzni (LAPIERRE és SIGNORET, 2004), ám hazánkban ezek közül nem mind található meg. Az előfordulók között azonban ott találjuk a világviszonylatban is legveszélyesebbnek tartott négy gabonavírust: a DNS tartalmú **búza törpülés vírust** (*wheat dwarf monogeminivirus* – WDV) és az RNS tartalmú **árpa csíkos mozaik vírust** (*barley stripe mosaic hordeivirus* – BSMV), **árpa sárga törpülés vírust** (*barley yellow dwarf luteovirus* – BYDV) és **búza csíkos mozaik vírust** (*wheat streak mosaic tritimovirus* – WSMV) (GÁBORJÁNYI, 1991). Közülük elsőként a BYDV-t azonosították őszi árpán (SZIRMAI, 1967), majd őszi búzán is (SZUNICS és SZUNICS, 1980). A BSMV hazai felfedezése MILINKÓ és REMETE (1984) nevéhez fűződik, WSMV-fertőzést pedig POCSAI és BARABÁS (1985) észlelték elsőként Magyarországon. Viszonylag későn, az 1980-as évek végén írták le a hazánkban a WDV-t (GÁBORJÁNYI et al., 1988).

Szántóföldi tünetek alapján a 2006/07-es, rendkívül enyhe ősz és tél különösen kedvezett a virális patogének elszaporodásának. Kísérletünkben PCR-alapú technika felhasználásával kívántuk kimutatni az előzőekben ismertetett négy vírust a GK KhT Kecskés-telepi tenyészkertjéből származó búzamintákból. A szántóföldi levélmintákból új, Magyarországon egyedülálló (félautomata) módszerrel izoláltunk növényi genomi DNS-t, saját tervezésű primereinkkel pedig gyorsan és egyszerűen tudtuk detektálni a vírusfertőzéseket.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag

Vizsgálati anyagunkat 31 búza levélminta képezte, amelyeket 2007. április 12-én gyűjtöttük be a Gabonatermesztési Kutató KhT., szegedi, Kecskés-telepi tenyészkertjéből. Az első 13 minta a vírusfertőzést természetes módszerrel provokáló, dupla sortávolságú tenyészterületből származott, a 14-31. minták pedig kisparcellás kísérletekből. Erőteljes tüneteket mutató és tünetmentes növényekről egyaránt gyűjtöttünk mintákat. A tünetek erősségét 0-tól 5-ig terjedő skálán az 1. és az 5. táblázatban tüntettük fel. A leveleket a

főér mentén kettéválasztottuk, s a levéllemez jobb és bal felét külön kezelve 30-30 mg-os levéldarabokat vágunk Eppendorf-csövekbe. A csöveket azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, majd felhasználásig New Brunswick Scientific C38085 típusú (CFC mentes), -80 °C-os ultrahűtőben tároltuk.

1. táblázat. Szántóföldi tünetek

Növény habitusa	Tüneti pont
teljesen tünetmentes növény zöld levelekkel	0
normál méretű növény enyhén sárguló levelekkel	1
normál méretű növény sárga-lila vagy csíkos levelekkel	2
törpe növény enyhén sárguló levelekkel	3
törpe növény, sárga-lila vagy csíkos levelekkel	4
törpe, erőteljesen bokrosodó növény teljesen elszíneződött levelekkel	5

Nukleinsavak izolálása

A szöveteket az alkalmazott protokolloktól eltérően nem mozsárban dörzsöltük el, hanem az Eppendorf-csövekben, lehűtött üvegbotok segítségével. A minták egyik feléből genomi DNS-t, másik részükből összes RNS-t tisztítottunk.

Genomi DNS izolálásához a Promega „Maxwell™ 16 Instrument” félautomata DNS-tisztító gépet és a hozzá gyártott „Maxwell™ 16 DNA Purification Kit”-et alkalmaztuk (KEPHART et al., 2006; PROMEGA, 2006/a) – elsőként Magyarországon. A technikai protokollt követve 600 µl lízispuffert mértünk rá az eldörzsölt levélmintákra, majd a szuszpenziót vágott hegyű pipettával visszamértük a kit első cellájába. A kitben található elúciós csövekbe 200 µl elúciós puffert mértünk be. A gép segítségével 42 perc alatt 16 mintából tudunk genomi DNS-t izolálni. A program lefuttatása után a párolgási veszteség miatt körülbelül 150 µl, DNS-t tartalmazó oldat maradt az elúciós csövekben, amelyet nukleázmentes Eppendorf-csövekbe pipettáztunk át.

Összes RNS izolálásához a Promega „SV Total RNA Isolation System” kitet használtuk, követve a gyártó által mellékelt protokoll utasításait (OTTO et al., 1998; KOBBS, 1998; PROMEGA, 2006/b). Az oldatok beméréséhez minden esetben nukleázmentes pipettahegyeket és Eppendorf-csöveket alkalmaztuk. Izolálás során a vákuumos technika helyett a centrifugás megoldást választottuk. A protokoll magában foglalta a DNáz-kezelést is. A tisztított összes RNS-eket 100 µl nukleázmentes vízben vettük fel.

Az izolált genomi DNS-ek és összes RNS-ek töménységét Ultrospec 4000 Pharmacia Biotech típusú spektrofotométerrel határoztuk meg, majd nukleázmentes vízzel egyformára állítottuk be a koncentrációkat.

Polimeráz láncreakció

Az egyforma koncentrációra hígított nukleinsavakat templátként felhasználva polimeráz láncreakciót indítottunk a vírusfertőzések detektálására. A reakciók során a 2. táblázatban ismertetett, saját tervezésű primerpárokat alkalmaztuk. Valamennyi mintát teszteltük az ubiquitin-ligáz génre tervezett „Ubi-306+Ubi-664” primerpárral, amely arról informált bennünket: alkalmasak-e a minták a polimeráz láncreakcióra. Ezen eredmények ismeretében a búza törpülés vírus (WDV) kimutatására hagyományos PCR-t mértünk össze, míg az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV), az árpa sárga törpülés vírus (BYDV) és a búza csíkos mozaik vírus (WSMV) detektálásához egylépéses reverz-transzkriptáz (RT)-PCR-t használtunk. A normál PCR-hez „Fermentas” gyártmányú oldatokat alkalmaztunk, míg az RT-PCR-hez a „Qiagen One Step RT-PCR Kit” oldatait használtuk fel, amellyel már sikerrel mutattak ki állati vírusokat (SCHWARZ et al., 2001). Az RT-PCR-ek reakcióelegyeit „RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor”-ral egészítettük ki. Utóbbi esetben a gyártó által mellékelt protokollon korábbi tapasztalataink alapján módosítottunk (3.

táblázat). A reakcióelegyek összemérése során minden oldatot jégen tartottunk és nukleázmentes pipettahegyeket alkalmaztunk. A reakciókat „MJ Research PTC 200” típusú gépben futtattuk le, a gép zárófedelének hőmérsékletét 104 °C-ra állítottuk be. A programok időtartama 85, illetve 120 perc volt (4. táblázat). Az RT-PCR-hez úgy terveztük meg a primereket, hogy ugyanazon program alkalmazásával lehetővé vált a BSMV, a BYDV és a WSMV szimultán detektálása, vagyis a komplex vírusfertőzések kimutatása.

2. táblázat. A vizsgálatok során használt, általunk tervezett primerpárok

Forward primer	Reverse primer	A felszaporított fragment mérete (bp)
Ubi-306	Ubi-664	1200
BSMV Bb-156	BSMV Bb-1178	1022
BYDV-PAV Sal 2-S for.	BYDV-PAV Sal 2-S rev.	514
WDV-S for.	WDV-S rev.	913
WSMV-1000	WSMV-1565	563

3. táblázat. A normál- és az RT-PCR-ek összemérése közötti különbségek

Taq-PCR (1 mintára)		RT-PCR (1 mintára)	
nukleázmentes víz	37,8 µl	nukleázmentes víz	11,3 µl
10x puffer	5,0 µl	5x puffer	4,0 µl
25 mM MgCl ₂	3,0 µl	dNTP	1,0 µl
4 mM (each) dNTP	1,0 µl	10 µM forward primer	1,0 µl
10 µM forward primer	1,0 µl	10 µM reverse primer	1,0 µl
10 µM reverse primer	1,0 µl	40 U/ µl RNáz inhibitor	0,2 µl
5 U/µl Taq-polimeráz	0,2 µl	enzim mix	0,5 µl
templát (genomi DNS)	1,0 µl	templát (összes RNS)	1,0 µl
Összesen	50,0 µl	Összesen	20,0 µl

4. táblázat. A normál- és az RT-PCR-ek programozása közötti különbségek.

Taq-PCR (WDV-fertőzés kimutatása)		RT-PCR (BSMV-, BYDV- és WSMV-fertőzés kimutatása)	
95 °C	3 min	50 °C	30 min
94 °C	15 sec	95 °C	15 min
62 °C	30 sec	94 °C	15 sec
72 °C	1 min	62 °C	30 sec
72 °C	5 min	72 °C	1 min
4 °C	∞	94 °C	15 sec
		68 °C	30 sec
		72 °C	1 min
		72 °C	5 min
		4 °C	∞
Összesen:	85 min		120 min

Gélelektroforézis

A polimeráz láncreakciót követően a termékeket 2000/perc fordulatszámmal centrifugáltuk 1 percre, majd pipettával összemértünk 2 µl bróm-fenol-kék festéket és 8 µl PCR-terméket. A keveréket agaróz gélre vittük fel, amely készítéséhez 0,5× TBE-puffert használtunk fel. A gél töménységét a várt fragmentméretektől függően 0,9-1,2 %-osra állítottuk be. A futtatást minden esetben 90 V feszültség mellett végeztük. Markerként 5 µl λPst₁-et vittünk fel a gélre. A futtatás után BioRad Gel Doc 2000 típusú kamerával fotóztuk le a géleket.

EREDMÉNYEK

Kísérletünk első lépéseként a Kecskés-telepi tenyésztertből származó búza levélmintákat két részre osztottuk. A vizsgálni kívánt vírusok örökítőanyagától függően a minták egyik részéből genomi DNS-t, a másik részéből pedig összes RNS-t izoláltunk. A vírusok (BSMV, BYDV, WDV, WSMV) kimutatása során az előző fejezetben ismertetett módszerekkel elért eredményeket az alábbiakban foglaltuk össze.

Minden Kecskés-telepről származó búzamintából nagy tisztaságú nukleinsavakat sikerült izolálnunk. Magyarországon elsőként alkalmaztuk a Promega „Maxwell™ 16 Instrument” félautomata DNS-tisztító gépet, amellyel jelentősen le tudtuk rövidíteni az izoláláshoz szükséges időt. A DNS-ek és RNS-ek koncentrációját egységesre állítottuk be. A vírusspecifikus PCR-ek elvégzése előtt leteszteltük, hogy mintáink alkalmasak-e templátnak a polimeráz láncreakció során. Valamennyi DNS és RNS minta pozitívnak bizonyult. Ennek ismeretében kezdtük el a kísérletünk lényegi részét képező vírusspecifikus PCR-eket.

Búza törpülés vírus (WDV) kimutatása búza levél mintákból

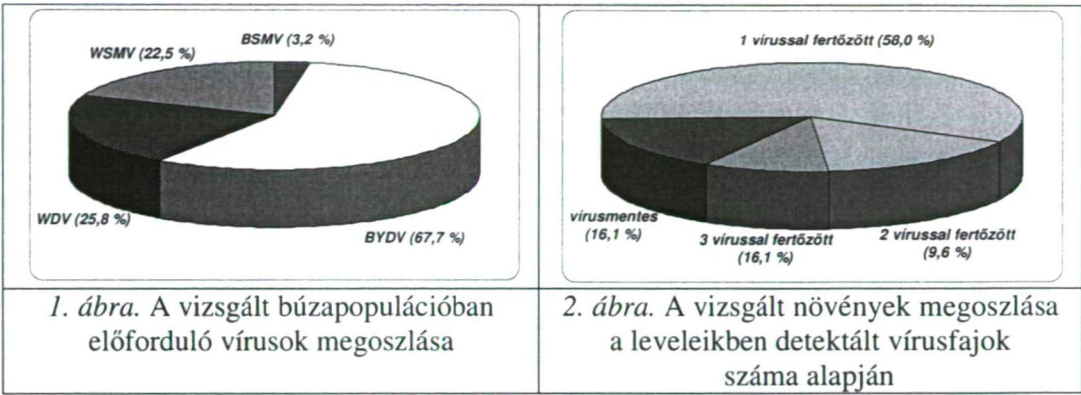
A búza törpülés vírus örökítő anyaga DNS, ezért ennek kimutatására normál PCR-reakciót indítottunk az általunk tervezett *WDV S forward* és *WDV S reverse* primerpárral. A reakció végén kapott termékeket agaróz gélen megfuttatuk, és a harmincegy minta közül nyolc esetben találtunk vírusfertőzésre utaló sávot (5. táblázat). A vizsgált búzapopulációban a WDV 25,8 %-os gyakorisággal fordult elő (1. ábra).

RNS-vírusok kimutatása búza növényi mintákból

A kísérletben vizsgált másik három vírus (árpa csíkos mozaik [BSMV], árpa sárga törpülés [BYDV] és búza csíkos mozaik [WSMV]) örökítő anyaga RNS, ezért ezek kimutatására RT-PCR-t indítottunk a szintén általunk tervezett, 2. táblázatban ismertetett primerpárokkal. A PCR-termékekkel elvégzett gélelektroforézis eredményét kielemezve a következő adatokhoz jutottunk. A vizsgált harmincegy búzamintából árpa csíkos mozaik vírussal fertőzöttnek bizonyult 1 növény, az árpa sárga törpülés vírus 21 esetben volt kimutatható, míg a búza csíkos mozaik 7 mintában jelentkezett (5. táblázat). A BSMV tehát 3,2 %-os, a BYDV 67,7 %-os, míg a WSMV 22,5 %-os gyakorisággal fordult elő Kecskés-telepen (1. ábra).

Komplex vírusfertőzések kimutatása

Huszonhat növényben, azaz a vizsgált populáció 83 %-ában mutattunk ki vírusfertőzést. Közülük tizennyolc búzamintában csak egy vírusfaj volt kimutatható. Öt növényben mutattuk ki kétféle vírus együttes jelenlétét, illetve három olyan mintát találtunk, amelyeket három vírus is megfertőzött. A vizsgálat alá vont négy vírus együttes jelenlétét egyetlen növényben sem detektáltuk (2. ábra).



5. táblázat. A Kecskés-telepen 2007 áprilisában gyűjtött búzaminták vírusfertőzöttsége

Sorszám	tünet (0-5)	BSMV	BYDV	WDV	WSMV	Σ
1	3		+	+		2
2	4		+	+	+	3
3	3		+	+		2
4	1		+			1
5	1		+			1
6	2		+	+		2
7	2				+	1
8	4		+	+	+	3
9	2		+	+	+	3
10	0					0
11	1		+		+	2
12	1				+	1
13	1			+		1
14	2		+			1
15	2		+			1
16	1					0
17	1					0
18	3		+			1
19	2		+			1
20	2		+			1
21	1		+			1
22	3		+			1
23	2		+			1
24	1					0
25	1		+			1
26	1		+			1
27	2	+				1
28	1		+			1
29	0					0
30	1		+			1
31	5			+	+	2
Σ	—	1	21	8	7	—

A tünetek és a fertőzöttség kapcsolata

A kapott eredmények alátámasztják a mintagyűjtés idején tapasztalt tüneteket. A tünetmentes növényekben nem detektáltuk vírusok jelenlétét, a 16-os, 17-es és 24-es minták esetében pedig – amelyekben nem detektáltuk egyik vírust sem – a tüneteket valószínűleg más vírusfajok okozták. A több vírussal fertőzött minták minden esetben erőteljesebb tüneteket mutattak, mint amelyekben csak egy vírus jelenlétét mutattuk ki. A legsúlyosabb szimptómák a WDV-vel és WSMV-vel fertőzött 31-es növényen jelentkeztek.

KÖVETKEZTETÉSEK

Intézetünkben öt éven át (1994-1999) DAS-ELISA teszttel végzett kísérleteinkben a most vizsgált négy vírus közel azonos mértékben volt kimutatható (MESTERHÁZY et al., 2002). Ehhez képest Kecskés-telepen az elmúlt tenyészidőszakban az árpa csíkos mozaik vírus (BYDV) fertőzte leggyakrabban az őszi vetésű búzatáblákat. Nagymértékű elterjedése a levéltetű vektorok felszaporodásával magyarázható, amelyek kolóniái a rendkívül enyhe tél miatt még decemberben is táplálkoztak a búzaföldeken (NYERGES, 2007). A búza törpülés vírus (WDV) és a búza csíkos mozaik vírus (WSMV) előfordulása közepesnek, míg az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV) jelenléte elenyészőnek mondható.

Komplex vírusfertőzéseket már több kutatócsoport is publikált (KRSTIC et al., 1995; MAHMOOD et al., 1998; MESTERHÁZY et al., 2002). Kísérletünkben a legtöbb növényből csak egy vírusfajt tudtunk kimutatni, de találtunk olyan mintákat is, amelyekben kettő vagy három vírus együttes jelenlétét detektáltuk. Mindez rávilágít arra, hogy a rezisztenciakutatási programok során a komplex vírusfertőzések leküzdését kell előtérbe helyezni.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezzük ki a KPI által finanszírozott Búzakalász Konzorcium (4 064 04) 5. feladatának a három éven át (2005-2007) tartó folyamatos támogatásért.

IRODALOMJEGYZÉK

- ACHON M. A. – SERRANO, L. (2006): First detection of wheat dwarf virus in barley in Spain associated with an outbreak of barley yellow dwarf. *Plant Disease*, 90: 970.
- CLARK, M. F. (1981): Immunosorbent assays in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, 19: 83-106.
- CLOVER, G. – HENRY, C. (1999): Detection and discrimination of wheat spindle streak mosaic virus and wheat yellow mosaic virus using multiplex RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 891-896.
- FABRE, F. – Kervarrec, C. – Mieuzet, L. – Riault, G. – Vialatte, A. – Jacquot, E. (2003): Improvement of barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 110: 51-60.
- FIGUEIRA, A. R. – DOMIER, L. L. – D'ARCY, C. J. (1997): Comparison of techniques for detection of barley yellow dwarf virus – PAV-IL. *Plant Disease*, 81 (11): 1236-1240.

- FRENCH, R. – ROBERTSON, N. L. (1994): Simplified sample preparation for detection of wheat streak mosaic virus and barley yellow dwarf virus by PCR. *Journal of Virological Methods*, 49: 93-99.
- FÜLE, T. – KOVALSZKY, I. (2002): Vírusok molekuláris diagnosztikája. *Magyar Onkológia*, 1: 17-22.
- GÁBORJÁNYI, R. – BISZTRAI, GY. – VACKE, J. (1988): Búza törpülés vírus: új gabonapatogén Magyarországon. *Növénytermelés*, 37: 495-500.
- GÁBORJÁNYI, R. – SZIRMAI, J. – BECZNER, L. – NAGY, P. D. (1991): Virus diseases of Graminae in Hungary. *Acta Phytopath. et Entomol. Hung.*, 26: 83-86.
- GITTON – DIAO – DUCROT – ANTONI – ADAMS - MARAITE (1999): A two-step RT-PCR method for simultaneous detection of soil-borne wheat mosaic virus and wheat spindle streak mosaic virus from France. *Plant Pathology*, 48 (5): 635-641.
- HABILI, N. – McInnes, J. L. – Symons, R. H. (1987): Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for the routine diagnosis of barley yellow dwarf virus. *Journal of Virological Methods*, 16: 225-237.
- HIDAKA, Z. – MURANO, H. (1957): Determination of size of the small particle compared with the width of the tobacco mosaic virus (TMV) in electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*, 5: 33-38.
- HORVÁTH, J. – GÁBORJÁNYI, R. (1999): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda, Budapest. 242-268.
- KEPHART, D. – KRUEGER, S. – GRUNST, T. – SHENOI, H. (2006): Introducing the Maxwell™ 16 Instrument: a simple, robust and flexible tool for DNA purification. *Promega Notes*, 92: 20-23.
- KOBBS, G. (1998): Isolation of RNA from plant, yeast and bacteria. *Promega Notes*, 68: 28-9.
- KRSTIC, B. – FORD, R. E. – SHUKLA, D. D. – TOSIC, M. (1995): Cross protection studies between strains of sugarcane mosaic, maize dwarf mosaic, Johnsongrass mosaic and sorghum mosaic potyviruses. *Plant Disease*, 79: 135-138.
- LAPIERRE, H. – SIGNORET, P. A. (eds.): 2004. Virus and Virus Diseases of *Poaceae* (Graminae). INRA, Paris. 857. pp.
- LISTER, R. M. – ROCHOW, W.F. (1979): Detection of barley yellow dwarf virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathology*, 69: 649-654.
- LIU, Y. – SUN, B. – WANG, X. – ZHENG, C. – ZHOU, G. (2007): Three dioxigenin-labelled cDNA probes for specific detection of the natural population of barley yellow dwarf viruses in China by dot-blot hybridization. *Journal of Virological Methods*, 145: 22-29.
- MAHMOOD, T. – HEIN, G. L. – JENSEN, S. G. (1998): Mixed infection of hard red winter wheat with high plains virus and wheat streak mosaic virus from wheat curl mites in Nebraska. *Plant Disease*, 82: 311-315.
- MALMSTROM, C. M. – SHU, R. (2004): Multiplexed RT-PCR for streamlined detection and separation of barley and cereal yellow dwarf viruses. *Journal of Virological Methods*, 120: 69-78.
- Maxwell™ 16 DNA Purification Kits. Technical Manual # TM284 (2006/a). Promega Corporation.
- MESTERHÁZY, Á. – GÁBORJÁNYI, R. – PAPP, M. – FÓNAD, P. (2002): Multiple virus infection on wheat in South Hungary. *Cereal Research Communications*, 30: 329-334.
- MILINKÓ, I. – REMETE, A. (1984): Fertőz a csíkos mozaik vírus. *Magyar Mezőgazdaság*, 39: 8.

- MUMFORD, R. – SKELTON, A. – METCALFE, E. – WALSH, K. – BOONHAM N. (2004): The reliable detection of barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 117: 153-159.
- NYERGES, K. (2007): Több figyelmet az őszi vetésekre! *Magyar Mezőgazdaság*, 11: 22.
- OTTO, P. – KEPHART, D. – BITNER, R. – HUBER, S. – VOLKER, K. (1998): Separate isolation of genomic DNA and total RNA from single samples using the SV Total RNA Isolation System. *Promega Notes*, 69: 19-23.
- POCSAI, E. – BARABÁS, Z. (1985): Wheat streak mosaic virus identifikálása Magyarországon. *Növényvédelem*, 21: 411.
- RATTI, C. – BUDGE, G. – WARD, L. – CLOVER, G. – RUBIES-AUTONELL, C. – HENRY, C. (2004): Detection and relative quantitation of soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 122: 95-103.
- ROBERTSON, N. L., French, R. Gray, S. M. (1991): Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology*, 72: 1473-1477.
- SCHWARZ, B. A. – TROSTORFF, A. – VAHLENKAMP, T. W. (2001): Detection of Bornavirus with the QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit. *Qiagen News*, 2: 4-5
- SCHWEITZER, B. – KINGSMORE, S. (2001): Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12: 21-27.
- SUKHACHEVA, E. – NOVIKOV, V. – PLAKSIN, D. – PAVLOVA, I. – AMBROSOVA, S. (1996): Highly sensitive immunoassays for detection of barley stripe mosaic virus and beet necrotic yellow vein virus. *Journal of Virological methods*, 56: 199-207.
- SV Total RNA Isolation System. Technical Manual #TM048 (2006/b). Promega Corporation.
- SZIRMAI, J. (1967): Új vírusbetegség gabonaföldjeinken. *Magyar Mezőgazdaság*, 22: 19.
- SZUNICS, L. - SZUNICS, LU. (1980): Vírus a búzán. *Magyar Mezőgazdaság*, 35: 9.
- TORRANCE, L. (1991): Developments in methodology of plant virus detection. *European Journal of Plant Pathology*, 2: 21-28.